

miRNA 尿素变性 PAGE 电泳套装 使用说明书

产品编号: SK0530 (500mL 胶)

储存条件: 制胶液和上样液短期 4°C保存, 长期-20°C保存, 有效期 2 年。

产品组成:

Components	SK0530	保存条件
15%尿素-PAGE 制胶液	500 mL	2-8°C
APS (过硫酸铵)	5×0.1 g	RT
TEMED	3 mL	RT/避光
miRNA 上样液	5 mL	2-8°C
1×TBE (RNase-free)	1L×2	RT
20%尿素-PAGE 制胶液	500 mL	2-8°C
说明书	1 份	

注意: 过硫酸铵 (APS) 为固体粉末, 使用前配制成 10% APS 溶液 (0.1 g APS 加 1mL 双蒸水)。APS 溶液最好现配现用, 通常 4°C可保存一周, -20°C能保存半年。

准备工作:

估计所需要的凝胶溶液的体积, 一般配制一块 13 cm×15 cm× 0.8 mm 的胶需要 15 mL 凝胶溶液, 配制一块 36 cm×45 cm×0.8 mm 的胶需要 120 mL 凝胶溶液。

操作步骤:

1. 取适量的制胶液于三角瓶中, 边摇晃溶液边加入 TEMED 和 10%过硫酸铵。(建议每 100mL 的加入量: 10% APS 500uL, 50-100uL 的 TEMED)
2. 再充分摇晃约 30 秒后迅速灌胶, 然后插入样品梳, 室温放置 30-60 分钟等待胶凝固。
3. 将凝胶板放置在电泳装置上后, 在上下层分别加入适当量的 1×TBE 电泳缓冲液。如果不马上使用, 需要有湿纸将上样孔端盖住以防凝胶过度干燥。
4. 拔出梳子后用加样枪吸取电泳缓冲液, 充分将每个加样空中未聚合的 Acrylamide/Bis、尿素和气泡吹打出来。

5. 在上样前，预电泳 20-30 分钟以使多余的过硫酸铵跑出加样空，同时还可 以使凝胶的温度升高（到 50°C左右），有利于 RNA 变性状态。
6. 将 miRNA 样品与等体积的 miRNA 上样液混合，70°C保温 2-3 分钟后迅速放置在冰上冷却，快速离心半分钟，放冰上待用。
7. 关电泳仪后开始上样。
8. 重开电泳仪，对 13 cm×15 cm 的胶，以 20-30mA 的电流电泳，直到红 色染料移动到凝胶边缘为止；对 36 cm×45 cm 的胶，则以 50-60mA 的 电流电泳，直到红色染料移动到凝胶边缘为止。
9. 染色观察：将凝胶一面的玻璃板揭开，直接用仍然附着在另一玻璃板上的凝胶进行各种染色，包括银染（固定、漂洗、显影和定影等步骤）、EB（每 100 mL 1×TBE 中加 20 uL 10mg/mL 的 EB 溶液）。UV 下观察并拍照。
10. miRNA 回收：按上法用 EB 等染料染色后，UV 下确定所需要的 miRNA 条带的位置，切胶后进行胶回收处理。
11. Northern 杂交：按上法用 EB 等染料染色后，UV 下确定所需要的 miRNA 条带的位置，切胶后电转移到带正电的尼龙膜上，然后进行杂交处理。
12. 放射自显影：如果 miRNA 样品电泳前经过同位素标记，则将凝胶一面的 玻璃板揭开，用滤纸将附着在另一玻璃板上的凝胶吸附过来，然后包上保 鲜膜，真空抽干，然后使胶跟 X 光片向对置进行放射自显影。

注: Acrylamide/Bis 的终浓度需要根据待分离 RNA 长度选择(见下表)。

需分离的 RNA 长度范围	Acrylamide/Bis 终浓度
6-100 nt	20%
25-150 nt	15%
40-200 nt	12%
60-400 nt	8%
80-500 nt	5%
1000-2000 nt	3.5%